

ЗАЙЦЕВА І. О.¹, БРОННІКОВА Л. І.²✉¹ Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара,
Україна, 49010, м. Дніпро, пр. Гагаріна, 72, ORCID: 0000-0001-5789-7240² Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, ORCID: 0000-0002-8103-0548

✉ Zlenko_lora@ukr.net

ОСМОСТІЙКІСТЬ КАЛЮСНИХ КУЛЬТУР ТЮТЮНУ, ОТРИМАНИХ ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

Мета. Встановлено, що стійкість до деяких катіонів важких металів поєднується із стійкістю до осмотичних стресів. Так, стійкість до катіонів барію та кадмію корелює із стійкістю до засолення та водного стресу, відповідно. Відомо також, що рівень стійкості клітинних культур і регенерантів з них не співпадає. Тому метою експерименту було порівняльне дослідження стійкості первинного і вторинного калюсів до модельованих стресів. **Методи.** Об'єктом тестування обрано тютюн – рослину чутливу до осмотичних стресів. Рівень стійкості варіантів оцінювали за показником відносного приросту свіжої маси за дії осмотичних стресів (засолення, 25,0 г/л солей морської води; водний стрес, 0,8 М маніту). Обидві концентрації летальні для клітинних культур тютюну дикого типу. **Результати.** Отримано первинні та вторинні Ва-стійкі і Cd-стійкі клітинні культури тютюну. Первинний і вторинний калюс тютюну відзначались стійкістю до летальних модельованих стресів. Ва-стійка культура розвивалася на середовищі із додаванням солей морської води; Cd-стійка культура розвивалась на середовищі із додаванням молекулярного осмотика. **Висновки.** Явище стійкості відбиралось у результаті первинної селекції на середовищі з іонами важких металів. Рівень осмостійкості не знижувався при збільшенні строку культивування.

Ключові слова: клітинна селекція, первинний і вторинний калюс, осмостійкість.

У відповідь на швидке, нерідко незворотне, погіршення довкілля сучасна біологічна наука висуває нові ідеології отримання форм рослин із підвищеним рівнем стресостійкості, а також оптимізує опрацьовані методології. При цьому для експериментів залучаються різноманітні процедури *in vitro*, які відзначаються рядом переваг, у порівнянні із традиційними методами селекції.

Одним із перспективних експериментальних підходів у цьому напрямку проявила себе клітинна селекція. Цей метод успішно поєднав рушійні сили системи *in vitro*, як такої, із різноманітними селективними системами. Це стало потужним комплексним ефектором, котрий суттєво пришвидшує відбір бажаних генетично змінених форм рослин.

Однак, як будь-який практичний підхід клітинна селекція має регулярно оптимізуватись у відповідності до зовнішніх завдань. Була висунута ідея застосування іонів важких металів (ІВМ) як селективних агентів для відбору генетично змінених форм рослин із покращеними характеристиками [1].

Серед ІВМ було обрано катіони барію Ba^{2+} та кадмію Cd^{2+} . З літератури відомо, що ці катіони суттєво взаємодіють із компартментами рослинних клітин, які координуються із процесами, пов'язаними із підтриманням / регуляцією різних аспектів осмотичного балансу. Так, іони Ba^{2+} є фізіологічними антагоністами іонів K^{+} і можуть порушувати процес пересування K^{+} у межах клітини, а також всередину / назовні [2, 3]. Іони Cd^{2+} негативно впливають на протеїни LEA, які належать до класу дегідринів – транспортерів води [4]. LEA, (*late embryogenesis abundant proteins*) виявляються в ядрі, цитоплазмі, мітохондріях. Оскільки сольовий та водний стреси можуть аналогічним чином негативно впливати на рослину, то логічним було припущення поєднання стійкості до ІВМ із стійкістю до осмотичних стресів [1].

На селективних середовищах із додаванням летальних для клітинних культур доз ІВМ були отримані клітинні лінії тютюну, сої, пшениці озимої, соняшника із комплексною стійкістю до летальних стресів. Із стійких клітинних ліній тютюну були регенеровані рослини, котрі тестували за умов осмотичних стресів. Регенеранти відзначались підвищеним рівнем стійкості до модельованих осмотичних стресів.

© ЗАЙЦЕВА І. О., БРОННІКОВА Л. І.

Чисельні дослідження феномену стійкості до осмотичних факторів встановили його полігенний характер [5]. У випадку стійкості клітинної культури реалізуються механізми клітинного підпорядкування. Якщо осмотичному стресу піддають цілісну рослину, то спрацьовують як клітинні фактори, так і реакції багатоклітинного організму. При цьому «успіх» життєздатності залежить від підтримання стабільності координації.

Паралельні дослідження стійких клітинних культур та рослин, із яких вони були отримані, часто вказують на неспівпадання рівнів стійкості клітинних культур і інтактною рослини. У деяких випадках регенеранти зовсім не експресували ознаку, якою відзначались клітини [6]. Іноді спостерігали втрату нової якості й у клітинних культур. Для встановлення збереження / втрати характеристики доцільно робити порівняльне тестування стійкої культури первинного відбору із вторинним калюсом, індукованим із регенованої рослини. У нашому випадку це особливо доцільно, оскільки первинна селекція відбувалась на середовищі з іншими чинниками, а саме ІВМ.

Матеріали і методи

Аналізували первинний і вторинний калюс. Первинний калюс – клітинні лінії, виділені на середовищах з ІВМ. Вторинний калюс індукований із рослин-регенерантів. Вихідним матеріалом були регенеранти тютюну, отримані із Ва-стійких і Cd-стійких клітинних ліній, R1. Рослини культивували *in vitro* на живильному середовищі Мурашіге-Скуга без регуляторів росту [7]. За таких умов підтримувалась стабільна вегетація. Коли рослина досягала оптимального розміру (розмір обмежувався із витрачанням середовища), її ділили на частки, котрі переносили на свіже середовище. Такий цикл вегетативного розмноження відповідав нормальним умовам життєдіяльності. Для індукування калюсу до середовища додавали ауксини та цитокініни згідно оригінального протоколу. Вторинну калюсну культуру отримували із фрагментів молодих листкових пластинок. Калюс нарощували та підтримували його проліферацію на середовищах того ж складу.

Для визначення рівня стійкості культури ділили на однакові частини, які переносили в

контрастні умови. Вторинний калюс Ва-стійкого тютюну переміщували на летальне засолення, а Cd-стійкого тютюну на модельований водний стрес.

Засолення створювали додаванням солей морської води (апроксимація природного сульфатно-хлоридного засолення), 25,0 г/л. Для створення водного стресу застосовували молекулярний осмотик маніт, 0,8 М. Обидві концентрації є летальними для клітинних культур тютюну дикого типу.

Для аналізу відбирались клітинні культури різного віку. Так, первинна Ва-стійка культура була віком 1,5 роки; Cd-стійка культура за віком перевищувала 1,0 рік; загальний вік вторинних культур сягав трьох місяців.

Рівень стійкості оцінювали за показником відносного приросту свіжої біомаси калюсу (Δm), за формулою:

$$\Delta m = (m_k - m_n) / m_n,$$

де m_n та m_k – початкова та кінцева маси калюсу відповідно [8].

Порівнювали активність проліферації первинного і вторинного калюсу.

Результати та обговорення

Дії модельованих осмотичних стресів надавали клітинні культури тютюну, а саме первинний і вторинний калюси спільного походження. Таким чином вони за генетичними показниками мали спільні риси. Обидві культури вирощувались за нормальних умов, тобто їхня онтогенетична програма реалізовувалась у повному обсязі [9]. Аналізували одну Ва-стійку клітинну культуру за дії засолення та дві Cd-стійких при додаванні маніту (табл.).

Від клітинних культур дикого типу тестовані варіанти різнились принципово. Відомо, що тютюн – рослина, чутлива до осмотичного тиску. Тому за умов жорстких стресів проліферація клітинних культур однозначно свідчила на користь їхньої стійкості. У таблиці наведено показники параметру відносного приросту біомаси за умов сольового та осмотичного стресу.

За нормальних умов (н. у.) спостерігали найвищу активність росту та розвитку клітинних культур, яка не виходила за межі норми реакції. В той же час за дії стресорів показник Δm суттєво знижувався. Цей факт потребує окремого аналізу.

Таблиця. Відносний приріст свіжої біомаси (Δm) калюсу стійких клітинних варіантів тютюну, культивованих за умов летальних осмотичних стресів

Генотипи	Нормальні умови	Морська сіль	Маніт
Ва-стійка клітинна культура			
Первинний калюс	6,38±0,44	0,52±0,09	Не культивували
Вторинний калюс	7,01±0,58	0,48±0,23	Не культивували
Cd-стійкі клітинні культури № 1, № 2			
Первинний калюс № 1	7,23±0,29	Не культивували	1,12±0,14
Вторинний калюс № 1	7,19±0,62	Не культивували	2,35±0,11
Первинний калюс № 2	5,83±0,22	Не культивували	2,97±0,34
Вторинний калюс № 2	6,04±0,11	Не культивували	1,50±0,18

Ва-стійка культура. На селективному середовищі із засоленням відмічали зниження відносного приросту біомаси як первинного, так і вторинного калюсу (табл.). Проте цей факт, на нашу думку, не може незаперечно вказувати на зниження активності росту. В літературі неодноразово відмічали та досліджували цей феномен [5, 9]. Причиною сукупного зменшення приросту культури за умов засолення було зменшення розміру структурних одиниць системи, окремих клітин. Це явище є адаптивним пристосуванням клітини, яке сприяє спрощенню підтримання потрібного осмотичного статусу, його вирівнюванню за рахунок акумуляції низькомолекулярних сумісних осмолітів [5, 10]. Ця характеристика властива стійким культурам. У нашому випадку Δm зменшувався як у первинного, так і у вторинного калюсу. При цьому за абсолютною величиною це зменшення було практично однаковим. Тобто варіанти ймовірно підтримували життєдіяльність аналогічним чином. Це, на наш погляд, є додатковим доказом активного характеру стійкості. Ця клітинна характеристика була відібрана при первинній селекції на середовищі з іонами Ba^{2+} . Не виключена ймовірність зв'язку цього факту із каналами, координуваними із переміщенням катіонів K^+ , а саме каналами АКТ1 (*affinity K^+ transporter*), [1, 11]. У цьому разі шкодочинність засолення знижуватиметься і за рахунок внутрішньоклітинного збереження фізіологічних іонів.

Аналізу піддавали первинний і вторинний калюс лише однієї лінії. Це було обумовлено суттєвим обмеженням регенерації [1]. Тому вважати отримані дані стосовно переваг Δm у вторинного калюсу універсальними для Ва-стійких варіантів нема підстав.

Cd-стійкі клітинні культури. Зниження відносного приросту свіжої біомаси калюсу відмічали за стресових умов у всіх Cd-стійких

варіантів. Слід зазначити, однак, що Cd-стійкі варіанти № 1 і № 2 ведуть себе протилежним чином, а саме: у варіанта № 1 параметр Δm у вторинного калюсу вдвічі перевищує показник первинного калюсу. В той же час у лінії № 2 має місце зворотний ефект.

Такі події, на нашу думку, стосуються швидше не первинного відбору на середовищі з катіонами кадмію. Наразі провідну роль відіграє система *in vitro*. На це опосередковано вказують протилежні реакції варіантів. Процеси, координовані з високим рівнем стійкості до осмотичних стресів у клітинних культур, повністю не з'ясовані [12]. Соматокони, які з'являються при пасажуваннях, можуть виникати в результаті чисельних подій, серед яких ампліфікації генів, зміни парної кількості хромосом, транспозиції, поліплоїдія, редукція окремих хромосом, метилування окремих залишків. Це процеси відбуваються в масиві культивованих клітин.

У літературі наводиться факт, що застосування гена *HVA1*, який кодує один із LEA протеїнів ячменю, у трансформантів ярої пшениці призводило до зростання рівня толерантності до водного дефіциту [13, 15]. У нашому випадку тому не виключена можливість появи відмінностей у рослин-регенерантів саме при їх ініціації. Так, Grauda D. із співавторами (2016) аналізували генетичне різноманіття рослин-регенерантів пшениці (*Triticum aestivum* L.), отриманих методом культури пиляків із гібридів, задіяних у селекції цієї культури в Латвії. Універсальним іPBS (inter primer binding sites) методом, який базується на аналізі характерних послідовностей ретротранспозонів, тестували 13 гібридів різного походження. В листках більшості рослин були міксоплоїдні клітини. Частка гексаплоїдних клітин і їх розподіл за плоїдністю залежали від генотипу материнської гібридної рослини. Частка спонтанної диплоїдизації також залежала від генотипу рослини. Причиною ге-

нетичного різноманіття автори вважають як розщеплення батьківських алелей, так і соматональну мінливість [14].

Інтактна рослина і клітинна культура являють собою гетерогенні відкриті біологічні системи. Обидві системи керуються взаємодією генотип / середовище (G/E). Джерелом гетерогенності клітинної культури можуть бути генетичні та епігенетичні зміни у вихідних соматичних клітинах рослин, з одного боку, а з іншого – події, котрі мають місце при культивуванні *in vitro*. Культура клітин об'єднує генотипові характеристики біологічного об'єкту із епігеномними особливостями, викликаними розвитком дискретної клітини поза організмом. Кожна клітина розвивається у відповідності з індивідуальною програмою. Тому розвиток клітинного масиву координується із співвідношенням компонентів системи [10, 15]. При цьому у рівному ступені має значення як ендогенна, так і екзогенна координація.

Первинний і вторинний калюс тютюну аналогічним чином піддавали стресовому тиску. Обидва типи культури відзначались стійкістю до осмотичних стресів. При цьому рівень стій-

кості калюсу не змінювався із зростанням віку культури (загальна кількість пасажів за нормальних умов).

Висновки

Первинний і вторинний калюс тютюну відзначався стійкістю до летальних осмотичних стресів. Ва-стійка культура розвивалася на середовищі із додаванням 25,0 г/л солей морської води. Cd-стійка культура розвивалась на середовищі із додаванням 0,8 М маніту. Показником активної життєдіяльності слугувало зростання відносного приросту свіжої біомаси.

Явище стійкості відбиралось у результаті первинної селекції на середовищі з іонами важких металів. Відсутність стресового чинника не впливала на зміну рівня стійкості. За стресових умов культура *in vitro* не здійснювала впливу на активність життєдіяльності стійких клітинних форм.

Клітинна селекція з іонами важких металів новий спосіб отримання ліній рослин із підвищеним рівнем стійкості до осмотичних стресів.

References

1. Sergeeva L. E., Bronnikova L. I. Cell selection with barium ions for obtaining genetically modified salt tolerant tobacco forms. *Visn. Cherkas. Univ. Ser. Biol.* 2020. Vol. 1. P. 71–78. doi: 10.31651/2076-5835-2018-1-2020-1-71-78.
2. Rubio F., Nieves-Cordon M., Aleman F., Martinez V. Relative contribution of AtHAK5 and AtHAK1 to K⁺ uptake in the high affinity range of concentrations. *Phys. Plant.* 2008. Vol. 134. P. 598–608.
3. Fan L. M., Wu W.-H., Yang Y.-Y. Identification and characterization the inward K⁺ channel in the plasma membrane *Brassica* pollen protoplasts. *Plant Cell Phys.* 1999. Vol. 40 (8). P. 859–865.
4. Tioleter D., Jaquinod M., Mangavel C., Passirani C., Saulner P., Manon S., Teyssier E., Payet N., Avelange-Macherel M.-H., Macherel D. Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein by desiccation *Plant Cell.* 2007. Vol. 19. P. 1580–1587. doi: 10.1105/tpc.107.050104.
5. Hasegawa P. M., Bressan R. A., Zhu J. K., Bohnert H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2000. Vol. 51. P. 463–499. doi: 10.1146/annurev.arplant.51.1.463.
6. Dracup M. Why does *in vitro* cell selection not improve the salt tolerance of plants? *Kluwer Academic Publishers.* 1993. P.137–142.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Phys. Plant.* 1962. Vol. 15. P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
8. Morran S., Eini O., Pyvovarenko T., Parent B., Singh R., Ismagul A., Eliby S., Shirley N., Langridge P., Lopato S. Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. *Plant Biot. J.* 2011. Vol. 9 (2). P. 230–249. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00547.x.
9. Zhou M., Zheng S. Multi-omics uncover the mechanism of wheat under heavy metal stress. *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23 (24). P. 1–16. doi: 10.3390/ijms232415968.
10. Xinran D., Mingxing S., Yang J., Suxiang X., Jieqiong S., Hongfei W., Li Q. A transcription factor *SINAC10* gene of *Suaeda liaotungensis* regulates proline synthesis and enhances salt and drought tolerance. *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23 (17). P. 1–18. doi: 10.3390/ijms23179625.
11. Wang D.-M., Zhang J.-L. Flowers T. J. Low affinity Na⁺ uptake in the halophyte *Suaeda maritima*. *Plant Phys.* 2007. Vol. 145. P. 559–571. doi: 10.1104/pp.107.104315.
12. Lestari E. G. *In vitro* selection and somaclonal variation for biotic and abiotic stress tolerance. *Biodiversitas.* 2006. Vol. 7 (3). P. 297–301.
13. Bahieldin A., Mahfouz H. T., Eissa H. F., Saleh O. M., Ramadad A. M., Ahmed I. A., Dyer W. E., El-Itriby H. A., Madkour M. A. Field evaluation of transgenic wheat plants stably expressing of *HVA1* gene for drought tolerance. *Phys. Plant.* 2005. Vol. 123 (4). P. 421–427. doi: 10.1111/j.1399-3054.2005.00470.x.
14. Grauda D., Žagata K., Lanka G., Strazdina V., Fetere V., Lisina N., Krasnevska N., Fokina O., Mikelsone A., Ornicans R., Belogradova I., Rashal I. Genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.), plants-regenerants produced by anther culture. *Vavilov J. Gen. Breed.* 2016. Vol. 20 (4). P. 537–544. doi: 10.18699/VJ16.176.

15. Alseekh S., Fernie A. R. Metabolomic 20 years on: what have we learned and what hurdles remain? *Plant J.* 2018. Vol. 94. P. 933–942. doi: 10.1111/tpj.13950.

ZAITSEVA I. A.¹, BRONNIKOVA L. I.²

¹ *Oles Honchar Dnipro National University, Ukraine, 49010, Dnipro, Haharyna avenue, 72*

² *Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivsa str., 31/17*

CALLI CULTURES OBTAINED VIA SELECTION WITH HEAVY METAL IONS AND THEIR OSMOTIC TOLERANCE

Aim. It is established that the resistance to some heavy metal cations is combined with the osmotic stress tolerance. The resistance to barium ions correlates with the salinity tolerance whereas the cadmium cation resistance is combined with water stress deficit. It is known too about the differences between the tolerance levels of cell cultures and tolerance levels of plants. On this account the comparative estimation of the primary and secondary calli to simulated stresses is established. **Methods.** The tobacco was the object of the experiment. This plant is extremely sensitive to osmotic stresses. The salinity was simulated by the addition of sea water salts – 25.0 g/l; water stress was created by the addition of 0.8M of mannitol. As calli proliferation marker relative fresh mass growth was used. **Results.** Primary and secondary tobacco calli there were obtained. Those cultures demonstrated resistance to lethal simulated stresses. Ba-resistant culture developed on medium with the addition of 25.0 g/l of sea water salts. Cd-resistant culture grew on medium. **Conclusions.** The appearance of tolerance is selected after the primary selection on media with heavy metal ions. The level of the tolerance did not decrease within the cultivating period.

Keywords: tobacco, cell selection, primary, secondary calli, osmotic stress tolerance.